

矽尘对小鼠肺组织TLR4 mRNA与RelA mRNA表达的影响

张兆强¹, 蔡娅琼², 张春芝¹, 聂继池¹, 林立¹

摘要:

[目的] 探讨矽尘对小鼠肺组织TOLL样受体4(TLR4)mRNA与核因子- κ B p65(RelA)mRNA表达的影响。

[方法] 将40只小鼠随机分成4组,每组10只,分别为2、4、8h暴露组(即每天吸入染尘2、4、8h)和对照组(不染尘),染尘20d后,取肺组织,应用实时荧光定量PCR法(RT-qPCR)测定各组TLR4 mRNA和RelA mRNA的表达。

[结果] 对照组与3个暴露组TLR4 mRNA表达量的中位数分别为0.89、1.22、4.89、7.21,4个组间的差异有统计学意义($\chi^2=4.93, P=0.02$);4、8h暴露组与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$),2h暴露组与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组和3个暴露组RelA mRNA表达量分别为0.96、1.33、2.23、3.04,4个组间差异有统计学意义($\chi^2=6.35, P=0.00$);4、8h暴露组与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$),2h暴露组与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$)。TLR4 mRNA与RelA mRNA两者之间具有相关性($r=0.99, P=0.00$)。

[结论] 矽尘染毒后小鼠肺组织TLR4 mRNA和RelA mRNA的表达上调,提示TLR4/RelA信号通路激活。

关键词: 矽尘; TLR4; RelA; mRNA; 小鼠

引用: 张兆强, 蔡娅琼, 张春芝, 等. 矽尘对小鼠肺组织TLR4 mRNA与RelA mRNA表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(1): 63-67. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16415

Effects of silica dust on expression of TLR4 mRNA and RelA mRNA in lung tissue in mice ZHANG Zhao-qiang¹, CAI Ya-qiong², ZHANG Chun-zhi¹, NIE Ji-chi¹, LIN Li¹ (1.Key Laboratory of Occupational Health and Environmental Medicine, School of Public Health, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China; 2.Jining No.1 People's Hospital, Jining, Shandong 272713, China). Address correspondence to LIN Li, E-mail: linli6711@sina.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To investigate the effects of silica dust on the expression of TLR4 mRNA and RelA mRNA in lung tissue of experimental mice.

[Methods] Forty mice were randomly divided into four groups with 10 mice in each group: control group (not exposed to silica dust), and 2, 4, and 8 h exposure groups (exposed to silica dust for 2, 4, and 8 h every day, respectively). After 20 days of exposure, lung tissues were dissected to detect the expression of TLR4 mRNA and RelA mRNA by RT-qPCR technology.

[Results] The median expression levels of TLR4 mRNA in the control group and three exposure groups were 0.89, 1.22, 4.89, and 7.21, respectively ($\chi^2=4.93, P=0.02$). Compared with the control group, the expression levels of TLR4 mRNA in the 4 h and 8 h exposure groups were both different ($P<0.05$), but that in the 2 h exposure group showed no significant changes ($P>0.05$). The expression levels of RelA mRNA in the control group and three exposure groups were 0.96, 1.33, 2.23, and 3.04, respectively ($\chi^2=6.35, P=0.00$). Compared with the control group, the expression levels of RelA mRNA in the 4 h and 8 h exposure groups were both significantly different ($P<0.05$), but that in the 2 h exposure group showed no significant changes ($P>0.05$). The expression levels of TLR4 mRNA and RelA mRNA showed a significant correlation ($r=0.99, P=0.00$).

[Conclusion] The elevated expressions of TLR4 mRNA and RelA mRNA in the lung tissue of mice exposed to silica dust indicate the activation of TLR4/RelA signaling pathway.

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 山东省卫生与计划生育委员会(编号: 2014WS0510); 济宁医学院科研计划项目(编号: JY2015KJ003)

[作者简介] 张兆强(1970—),男,副教授;研究方向:职业卫生与职业医学;E-mail: zzqtoxi@163.com

[通信作者] 林立, E-mail: linli6711@sina.com

[作者单位] 1. 济宁医学院公共卫生学院职业卫生与环境医学重点实验室, 山东 济宁 272067; 2. 济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272713

Keywords: silica dust; TLR4; RelA; mRNA; mouse

Citation: ZHANG Zhao-qiang, CAI Ya-qiong, ZHANG Chun-zhi, et al. Effects of silica dust on expression of TLR4 mRNA and RelA mRNA in lung tissue in mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(1): 63-67. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16415

矽肺是一种以肺纤维化为主的全身性疾病,具有渐进性和不可逆性的特点,对患者本人和社会都带来极大的危害。其发病的具体机制目前尚未完全阐明^[1],一般认为巨噬细胞在肺纤维化的发生中具有重要意义^[2],机体接触矽尘后巨噬细胞所产生的各类炎性细胞因子是形成肺纤维化的关键因素之一^[3-4]。肺巨噬细胞接受矽尘刺激所产生的各类细胞因子信号通路成为人们关注的焦点。有研究提示,外源性物质可作用于TOLL样受体(Toll-like receptors,TLRs)^[5],可激活核因子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells,NF-κB)系统,将信号传递给DNA,翻译出能表达相应生物学效应的蛋白质^[6]。目前尚未见矽尘对该信号转导通路影响的文献报道。本研究采用矽尘对整体动物进行染尘的方法,应用分子生物学手段观察染尘小鼠肺组织内TLRs中的TLR4 mRNA和NF-κB中最具有代表性的RelA(NF-κB p65)mRNA表达的改变,研究其中的信号转导过程,为肺纤维化的发病机制及防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组

昆明系小鼠40只,雌雄各半,体重(20±2)g,由济宁医学院实验动物中心提供,动物质量合格许可证编号:SCXK(晋)2009-0001。将小鼠随机分为4组,分别为2、4、8h暴露组和对照组,每组10只。除实验因素不同外,各组小鼠饲养条件完全相同。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器: DYY-4C电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂,中国),微量荧光紫外分光光度计(Quawell公司,美国),凝胶成像系统(Protein Simple公司,美国),台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,中国),Arktik5020多功能PCR仪(thermo公司,美国),

实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司,美国)。

主要试剂: SiO₂粉尘(天津市北联精细化学品开发有限公司,中国),Trizol试剂[生工生物工程(上海)有限责任公司,中国],琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司,中国),PrimeScript RT reagent、SYBR® Fast qPCR Mix(大连宝生物工程有限公司,中国),引物及内参的设计及合成[生工生物工程(上海)有限责任公司,中国]。

1.3 实验方法

1.3.1 染尘试验 将各暴露组小鼠置于染尘柜(体积为0.5m³)中,该设备呈圆柱形,下设进气孔。实验时将小鼠分散置于染尘柜中,准确称取SiO₂粉尘62.5mg,置于进气孔处的染尘盘中,用大功率鼓风机将矽尘向上吹起,使其悬浮于染尘柜中,粉尘质量浓度(后称“浓度”)为125mg/m³^[1]。本次实验所使用的SiO₂粉尘使用焦磷酸法测得其游离SiO₂含量>95%,使用滤膜法测得粒径<5μm的粉尘占总粉尘的比例为95%。相同浓度条件下,依据每天染尘时间的长短分为2h、4h和8h暴露组,另设一个对照组,对照组不染尘;染尘总时程为20d。

1.3.2 肺组织总RNA提取 染尘结束后,处死小鼠,取肺组织,Trizol法提取总RNA,微量紫外分光光度计测其纯度和浓度,凝胶电泳法检测RNA质量。

1.3.3 逆转录反应 将总RNA溶液稀释至200ng/μL,按PrimeScript RT reagent说明书逆转录生产cDNA,条件控制为37℃,逆转录反应15min后,85℃加热5s使逆转录酶失活,4℃保存备用。

1.3.3 RT-qPCR反应 按试剂盒说明书对获得的cDNA进行RT-qPCR反应,各基因引物见表1。反应条件为:预变性95℃,30s;变性95℃,5s;退火/延伸60℃,30s;共40个循环。并按照实时荧光定量PCR仪规定,添加溶解曲线,溶解曲线的温度为65~95℃,每升高

表1 各基因PCR引物序列

基因	上游引物(5' 3')	下游引物(5' 3')	基因扩增长度(bp)
TLR4	TCAGAGCCGTTGGTGTATCTT	CCTCAGCAGGGACTTCTCAA	122
RelA	GACCTGGAGCAAGCCATTAG	CACTGTACCTGGAAGCAGA	123
GAPDH	AGCAGTCCCGTACACTGGCAAAC	TCTGTGGTGATGTAATGTCCTCT	179

0.5℃, 进行一次荧光扫描。每个样本设3个复孔和一个阴性对照。

1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计学软件进行分析, 结果用 P_{25} 、 P_{50} 、 P_{75} 表示, 采用非参数检验中的多个独立样本的秩和检验(Kruskal-Wallis法)进行总体差异的比较, 并将其秩次重新输入SPSS后, 用LSD法比较各暴露组与对照组的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

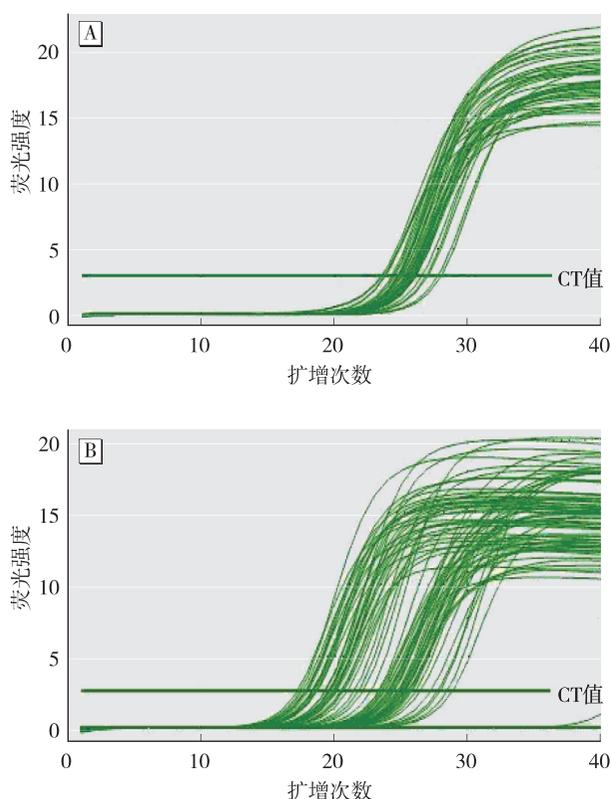
2 结果

2.1 肺组织中所提取的总RNA

用Trizol法提取总RNA, 1.0%的琼脂糖凝胶电泳, 可见28S和18S两条带, 提示RNA完整, 无降解。紫外分光光度计检测 D_{260}/D_{280} 在1.8~2.0之间。

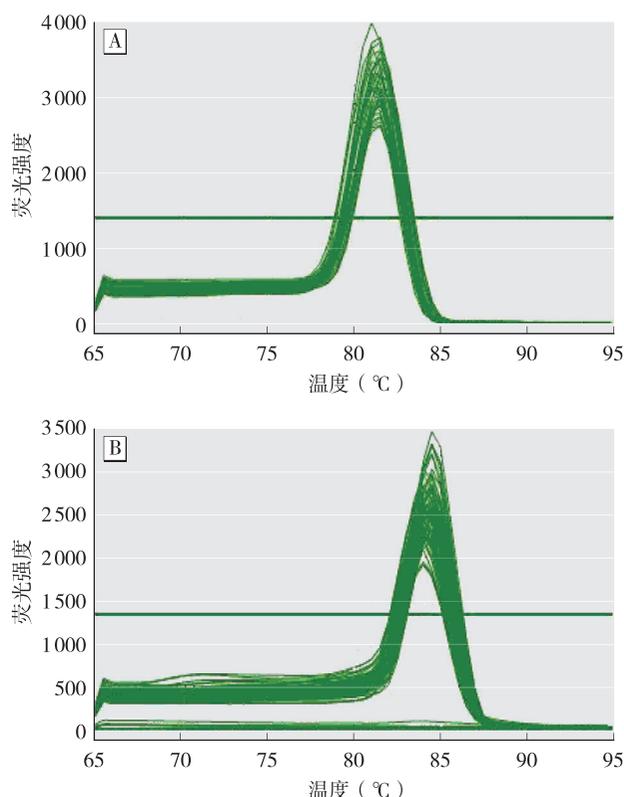
2.2 TLR4 mRNA和RelA mRNA的RT-qPCR扩增曲线及溶解曲线

由图1可见TLR4 mRNA和RelA mRNA扩增曲线圆滑, 荧光快速增长区域分布合理, 提示扩增效果佳; 由图2可见TLR4 mRNA和RelA mRNA溶解温度分别为81℃和84℃, 峰单一, 说明无非目的扩增物出现。



[注]A: TLR4 mRNA的RT-qPCR扩增曲线; B: RelA mRNA的RT-qPCR扩增曲线。

图1 TLR4 mRNA和RelA mRNA的RT-qPCR扩增曲线



[注]A: TLR4 mRNA的RT-qPCR溶解曲线; B: RelA mRNA的RT-qPCR溶解曲线。

图2 TLR4 mRNA和RelA mRNA的RT-qPCR溶解曲线

2.3 肺组织TLR4 mRNA和RelA mRNA的表达

4个组之间TLR4 mRNA表达差异有统计学意义($\chi^2=4.93, P=0.02$); 4、8h暴露组与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$), 2h暴露组与对照组之间无差异。4个组间RelA mRNA表达差异有统计学意义($\chi^2=6.35, P=0.00$), 4、8h暴露组与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$), 2h暴露组与对照组之间无差异。见表2。对TLR4 mRNA与RelA mRNA两者进行相关性分析, 发现两者具有相关性($r=0.99, P=0.00$)。

表2 各暴露组肺组织TLR4 mRNA和RelA mRNA的表达($n=10$)

组别	TLR4 mRNA			RelA mRNA		
	P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{25}	P_{50}	P_{75}
对照组	0.68	0.89	1.17	0.49	0.96	1.57
2h暴露组	0.63	1.22	1.85	0.85	1.33	1.94
4h暴露组	1.71	4.89*	7.92	1.60	2.23*	2.95
8h暴露组	3.03	7.21*	11.07	1.77	3.04*	4.25

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

TOLL-NF- κ B信号转导系统是机体对抗外源性刺激、产生相关细胞因子的信号转导途径之一^[5,7]。其

中TOLL样受体作为巨噬细胞膜上的识别受体,可通过对入侵机体的病原体和其他损伤因素进行威胁识别,启动免疫应答^[6]。该类受体在机体内分布广泛,其中跟巨噬细胞关系密切的有TLR2、TLR4及TLR9^[8]。NF- κ B是一组普遍存在于细胞质中的快反应转录因子,位于TLRs下游信号通路的枢纽位置,普遍以无活性的NF- κ B-I κ B复合体形式存在于静止细胞的细胞质中。当接受到TLRs的信号后,NF- κ B与I κ B解离并进入细胞核,在细胞核内与DNA特定序列结合,促进产生特定的效应蛋白^[5]。NF- κ B包括5个成员:RelA(NF- κ B p65)、c-Rel、RelB、NF- κ B 1(p50/p105)、NF- κ B 2(p52/p100),其中研究最为广泛的为RelA。作为机体应答外界刺激的重要方式,Toll样受体诱发的核因子 κ B(TLR4-NF- κ B)信号转导系统,在促炎细胞因子介导的发病中起着至关重要的作用^[9-10]。目前针对TLRs的研究,多集中在病原微生物或其产物上^[5,9,11],对SiO₂粉尘的TLRs信号转导途径的研究尚未开展。有学者发现,石英尘进入肺脏后,表面的Si—OH结构可以与水分子紧密结合,形成类似于结晶型单钠尿酸盐结构的复合体,此结构与病原体相关分子相似,推测其可以被TLR2和TLR4识别^[11]。本研究即以此为切入点,研究了染尘动物肺组织TLR4-RelA的信号转导过程。

本研究的结果显示,与对照组相比,4h、8h暴露组TLR4 mRNA和RelA mRNA的表达均升高,暴露时间越长,表达越明显,且两者之间具有相关性。TLR4 mRNA和RelA mRNA表达增高,表明这两个基因对应的TLR4受体和RelA蛋白的合成增加。矽尘进入肺组织后,可作为外源性的配体结合于巨噬细胞的TLR4受体上。随着矽尘的增加,巨噬细胞上原有的TLR4不能满足配体的需求,于是机体相应的DNA启动,以合成更多的TLR4受体,这与Ansari等^[12]发现机体内毒素暴露可导致TLR4受体升高是一致的。矽尘越多,TLR4 mRNA的表达就越强,生成的TLR4受体也就越多。该受体将信号传给细胞质内RelA-I κ B复合物,使其发生解离,形成具有生物活性的转录因子RelA进入细胞核^[5],诱导TGF β 1基因的活化^[13],造成肺组织成纤维细胞增殖^[14]。细胞质内RelA蛋白量的下降,机体启动RelA mRNA的转录,以补足细胞质中RelA蛋白的不足。这与Tully等^[15]学者发现屋尘螨的刺激能导致NF- κ B表达升高相一致。可见,TLR4受体和RelA蛋白的增加是相互联系的,TLR4 mRNA的表达和

RelA mRNA的表达之间具有相关性,也充分证明了这一点。

矽肺的发生是一个漫长的过程,从业工人从接触到发病一般在10年以上。本研究作为急性染尘实验,虽然证实了TLR4-RelA的信号转导过程在肺纤维化发生机制中的作用,但在实际矽肺发生发展中是否起作用及其作用大小尚待进一步研究。此外,本研究2h暴露组TLR4 mRNA和RelA mRNA的表达也出现了一定程度的上升,但与对照组比较差异并无统计学意义,可能与染尘的总剂量小或肺的代偿功能有关。

参考文献

- [1] 张兆强,公维磊,徐晶,等. 石雕作业职业病危害因素对小鼠学习记忆能力的影响及其作用机制[J]. 职业与健康, 2015, 31(9): 1176-1178.
- [2] Gilberti R M, Knecht D A. Macrophages phagocytose nonopsonized silica particles using a unique microtubule-dependent pathway[J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(3): 518-529.
- [3] Luna-Gomes T, Santana P T, Coutinho-Silva R. Silica-induced inflammasome activation in macrophages: role of ATP and P2X7 receptor[J]. Immunobiology, 2015, 220(9): 1101-1106.
- [4] Oruqaj G, Karnati S, Vijayan V, et al. Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(16): E2048-E2057.
- [5] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF- κ B信号途径及其介导的功能[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(4): 483-486.
- [6] 何维. Toll样受体和天然免疫[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(10): 1054-1056.
- [7] 曹征,朱健,陆平,等. HSP70与TLR-NF- κ B信号途径在急性肺损伤发病机制中作用的实验研究[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(3): 406-411.
- [8] Dai H, Pan L, Lin F, et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptors 2, 4, and 9 on alveolar macrophages in a ventilator-induced lung injury model[J]. J Thorac Dis, 2015, 7(4): 616-624.
- [9] He M, Ichinose T, Liu B, et al. Silica-carrying particulate matter enhances Bjerckandera adusta-induced murine lung eosinophilia[J]. Environ Toxicol, 2016, 31(1): 93-105.
- [10] Babazada H, Yamashita F, Hashida M. Suppression of

- experimental arthritis with self-assembling glycol-split heparin nanoparticles via inhibition of TLR4-NF- κ B signaling[J]. *J Control Release* ,2014 ,194 : 295-300.
- [11]余杰,毛丽君,赵金垣. 二氧化硅通过肺泡巨噬细胞的识别反应启动肺内炎性损伤的机制[J]. *中国工业医学杂志* ,2015 ,28(4): 265-269.
- [12]Ansari AR ,Ge XH ,Huang HB ,et al. Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of toll-like receptor 4 in the chicken trachea and lung[J]. *Avian Pathol* ,2016 ,45 (5): 530-537.
- [13]路景涛,孙妩弋,刘浩,等. 白芍总苷对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 NF- κ B 和 TGF- β 1 蛋白表达的影响[J]. *中国药理学通报* ,2008 ,24(5): 588-592.
- [14]Asghari MH ,Hobbenaghi R ,Nazarizadeh A ,et al. Hydroalcoholic extract of *Raphanus sativus* L. var niger attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via decreasing transforming growth factor β 1 level[J]. *Res Pharm Sci* ,2015 ,10(5): 429-435.
- [15]Tully JE ,Hoffman SM ,Lahue KG ,et al. Epithelial NF- κ B orchestrates house dust mite-induced airway inflammation , hyperresponsiveness ,and fibrotic remodeling[J]. *J Immunol* ,2013 ,191(12): 5811-5821.
- (收稿日期: 2016-05-30 ; 录用日期: 2016-09-12)
(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 陈姣)

(上接第 52 页)

- [12]Wu X ,Gao M ,Wang L ,et al. The arsenic content in marketed seafood and associated health risks for the residents of Shandong ,China[J]. *Ecotoxicol Environ Saf* ,2014 ,102 : 168-173.
- [13]Nriagu JO ,Azcue JM. Environmental sources of arsenic in food[J]. *Adv Environ Sci Technol* ,1990 ,23 : 103-127.
- [14]食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [15]杨天池,施家威,毛国华. 宁波地区滩涂海产品重金属与多氯联苯污染状况及其环境相关性分析[J]. *中国卫生检验杂志* ,2013 ,23(9): 2157-2159 ,2161.
- [16]Jović M ,Stanković S. Human exposure to trace metals and possible public health risks via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic coastal area[J]. *Food Chem Toxicol* ,2014 ,70 : 241-251.
- [17]Kumar V ,Sinha AK ,Rodrigues PP ,et al. Linking environmental heavy metal concentrations and salinity gradients with metal accumulation and their effects : a case study in 3 mussel species of Vitória estuary and Espírito Santo bay , Southeast Brazil[J]. *Sci Total Environ* ,2015 ,523 : 1-15.
- [18]Tessier L ,Vaillancourt G ,Pazdernik L. Comparative study of the cadmium and mercury kinetics between the short-lived gastropod *Viviparus georgianus*(Lea) and pelecypod *Elliptio complanata*(Lightfoot) , under laboratory conditions[J]. *Environ Pollut* ,1994 ,85(3): 271-282.
- [19]江天久,徐轶肖,冷科明. 深圳市场水产品中重金属与农药的含量及评价[J]. *暨南大学学报(自然科学版)* ,2005 ,26(3): 417-421.
- [20]林美金. 深圳市售贝类重金属含量调查与评价[J]. *河北农业科学* ,2010 ,14(5): 91-94.
- [21]张秦蕾. 深圳市售生鲜水产品中重金属的风险评估[J]. *广东化工* ,2015 ,42(17): 71-72.
- (收稿日期: 2016-04-10 ; 录用日期: 2016-09-12)
(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 陈姣)